

Stavrianopoulos et al., Serial No. 08/486,070 (Filed June 7, 1995)
Exhibit 3 [Fifth Supplemental IDS -- February 6, 2006]

EXHIBIT 3

Enz-7(P)(C3)

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ³ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 83/ 02286 (43) Date de publication internationale: 7 juillet 1983 (07.07.83)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR82/00220 (22) Date de dépôt international: 23 décembre 1982 (23.12.82) (31) Numéro de la demande prioritaire: 81/24131 (32) Date de priorité: 23 décembre 1981 (23.12.81) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TCHEN, Paul [FR/FR]; 18, rue du Télégraphe, F-92000 Nanterre (FR). CAMI, Anne, Brigitte [FR/FR]; 48, rue Paul Barruel, F-75015 Paris (FR). LENG, Marc [FR/FR]; 50, rue de la Racinerie, F-45590 St Cyr en Val (FR). KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 207, rue de Vaugirard, F-75015 Paris (FR).	(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Cabinet Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), GB (brevet européen), JP, US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: PROBE CONTAINING A MODIFIED NUCLEIC ACID RECOGNIZABLE BY SPECIFIC ANTIBODIES AND UTILIZATION OF SAID PROBE TO TEST FOR AND CHARACTERIZE AN HOMOLOGOUS DNA SEQUENCE (54) Titre: SONDE CONTENANT UN ACIDE NUCLEIQUE MODIFIE ET RECONNAISSABLE PAR DES ANTICORPS SPECIFIQUES ET UTILISATION DE CETTE SONDE POUR DETECTER ET CARACTERISER UNE SEQUENCE D'ADN HOMOLOGUE (57) Abstract <p>Method for detecting the presence of a nucleic acid sequence such as a gene or a gene fragment in a composition or sample which is supposed to contain it. It is characterized in that said composition is contacted with a probe containing a nucleic acid complementary of the nucleic acid sequence or of the gene searched for in certain conditions enabling particularly such hybridation, the probe carrying at least a N-2-acetylaminofluorene group fixed covalently to at least one of the bases of said probe, the possible presence of the nucleic acid sequence or the gene searched for being then revealed by the action of efficient antibodies in relation to the N-2-(guanosine-8-yl)-acetylaminofluorene or antibodies which have been previously prepared in relation to the probe carrying acetylaminofluorene residues.</p> (57) Abrégé <p>Procédé de détection de la présence d'une séquence d'acide nucléique telle qu'un gène ou fragment de gène dans une composition ou échantillon présumé la contenir. Elle est caractérisée en ce que l'on met en contact cette composition avec une sonde contenant un acide nucléique complémentaire de la séquence d'acide nucléique ou du gène recherché dans des conditions permettant notamment cette hybridation, ladite sonde portant au moins un groupe N-2-acetylaminofluorène fixé de façon covalente à au moins l'une des bases de cette sonde, l'éventuelle présence de la séquence d'acide nucléique ou de gène recherché étant ensuite révélabile par action d'anticorps efficaces vis-à-vis de la N-2-(guanosine-8-yl)-acetylaminofluorène ou préalablement préparés vis-à-vis de la sonde portant des résidus d'acetylaminofluorène.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	LI	Liechtenstein
AU	Australie	LK	Sri Lanka
BE	Belgique	LU	Luxembourg
BR	Brésil	MC	Monaco
CF	République Centrafricaine	MG	Madagascar
CG	Congo	MR	Mauritanie
CH	Suisse	MW	Malawi
CM	Cameroun	NL	Pays-Bas
DE	Allemagne, République fédérale d'	NO	Norvège
DK	Danemark	RO	Roumanie
FI	Finlande	SE	Suède
FR	France	SN	Sénégal
GA	Gabon	SU	Union soviétique
GB	Royaume-Uni	TD	Tchad
HN	Hongrie		

- 1 -

Sonde contenant un acide nucléique modifié et reconnaissable par des anticorps spécifiques et utilisation de cette sonde pour détecter et caractériser une séquence d'ADN homologue

L'invention est relative à une sonde contenant un acide nucléique modifié et reconnaissable par des anticorps spécifiques et à l'utilisation de cette sonde pour détecter et caractériser une séquence d'ADN homologue dans un échantillon susceptible de le contenir. Plus particulièrement l'invention concerne une sonde modifiée chimiquement de telle sorte qu'elle puisse, après hybridation avec la séquence d'ADN homologue recherchée, être détectée par des anticorps spécifiques à l'égard de la sonde elle même.

Il est connu que des ADN sont susceptibles de réagir dans des conditions appropriées avec des substances carcinogènes, telles que le N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène, pour former un produit susceptible d'être reconnu par des anticorps formés, d'une part, contre le N-2(guanosine-8-yl)-acétylamino-fluorène et, d'autre part, contre les mêmes ADN modifiés par le N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène. Ces techniques ont notamment été décrites dans un article de Gilbert de MURCIA et collaborateurs intitulé "Visualisation par microscopie électronique des sites de fixation du N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène sur un ADN de ColE 1 au moyen d'anticorps spécifiques" (Proc. Natl. Acad. Sci USA, tome 76, N° 12, 6 076 - 6 080 Dec. 1979)".

Dans les conditions décrites par ces auteurs il est possible de modifier de 0,07 à 0,15 % des bases de l'ADN traité par le N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène, les points de fixation de cette dernière substance chimique sur l'ADN pouvant ensuite être repérés par microscopie électronique, après réaction préalable de l'ADN ainsi modifié avec des anticorps du genre sus-indiqué préalablement formés chez le lapin, puis avec des anti-immunoglobulines de lapins marqués à la ferritine. La technique décrite permet par conséquent de distinguer des ADN natifs sains

- 2 -

et des ADN ayant été soumis à l'action de substances carcinogènes.

L'invention repose sur la découverte que la modification d'une séquence d'ADN par le N-acétoxy-N-2-acétylamino fluorène n'altérerait pas, après dénaturation préalable de cet ADN modifié, sa capacité de s'hybrider avec une séquence complémentaire d'ADN ne portant pas de tels groupes de modification, lorsque ces séquences sont placées dans des conditions permettant une telle hybridation.

L'invention tire profit de cette découverte pour proposer un procédé perfectionné de détection de la présence éventuelle et de la caractérisation d'une séquence ou d'un fragment déterminé d'acide nucléique, notamment d'un gène au sein d'une composition susceptible de le contenir.

Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que l'on met en contact avec la composition présumée contenir une séquence ou un fragment déterminé d'acide nucléique, une sonde contenant un acide nucléique complémentaire susceptible de s'hybrider avec la séquence d'acide nucléique ou le gène recherché, la sonde étant plus particulièrement caractérisée en ce qu'elle porte au moins un groupe N-2 acétylamino fluorène fixé de façon covalente à au moins l'une des bases de cette sonde, l'éventuelle présence de la séquence d'acide nucléique ou de gène recherché étant ensuite révélabile par action d'anticorps efficaces vis-à-vis de la N-2-(guanosine -8-yl)-acétylamino fluorène ou préalablement préparés vis-à-vis de la sonde portant des résidus d'acétylamino fluorène (ci-après dénommés DNA-AAF).

Il va de soi que le procédé revendiqué dans le cadre de la présente demande s'étend à l'utilisation de tout autre groupe chimique fixable sur un ADN dans les conditions décrites par de MURCIA et coll.

Naturellement, il va de soi que le DNA-AAF utilisé comme sonde est mis en présence de l'ADN à étudier dans des conditions permettant le réappariement de séquences complémentaires, ce qui implique naturellement une dénatura-

- 3 -

tion préalable dans des conditions bien connues des ADN susceptibles de s'hybrider mutuellement.

Après hybridation, l'ADN-AAF non hybridé de façon spécifique est de préférence éliminé par rinçage avant que l'on ne procède à la détection des hybrides formés, notamment par leur mise en présence avec des anticorps anti-DNA-AAF, qui peuvent alors se fixer sur la sonde à la fois modifiée et hybridée avec la séquence d'ADN recherchée, lorsque celle-ci était présente dans la composition utilisée.

Après rinçage des anticorps excédentaires encore présents, les anticorps fixés peuvent être, soit précipités, soit révélés.

De préférence, la révélation est faite au moyen d'un anticorps anti DNA-AAF, avantageusement marqué par une enzyme dont on peut ensuite détecter ou doser l'activité vis-à-vis d'un substrat spécifique. Avantageusement on utilisera celles des enzymes qui sont susceptibles d'induire une réaction colorée au niveau des substrats correspondants.

La révélation à l'aide d'enzymes donnant des réactions colorées est très rapide.

La méthode est très sensible, surtout si on utilise des systèmes amplificateurs (chapelets, arbres ou boules d'anticorps associés à des enzymes), de sorte qu'elle permette de localiser des gènes après hybridation in situ sur des chromosomes, par exemple dans le cas de diagnostics prénatals.

La méthode peut être quantitative, par mesure de l'intensité de la coloration.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'un exemple type de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

- 4 -

On a fait usage des matières et méthodes suivantes :

Les A D N :

- ADN de phage pBR 322 portant une séquence de
gène de ribosome de hamster de 6,6 kb insérée au site EcoRI
5 (clône PWE 6)

- ADN distinct de phage λ 57 comme témoin négatif.

L'A D N traité à l'A A F (DNA-AAF)

De l'ADN du clône PWE6 a été linéarisé (par l'en-
zyme de restriction Sal I) et traité à l'AAF selon la
10 technique décrite par G. de MURCIA et al (PNAS vol. 76
N° 12 p. 6 076 - 6 080 1979). Le nombre des guanines mo-
difiées a été estimé à 2% du nombre de paires de bases
par mesure de la densité optique à 305 nm et 260 nm.

Les anticorps :

15 - sérum DNA-AAF obtenu par immunisation d'un lapin
- anticorps anti Guo-AAF de lapin purifié sur
colonne d'affinité,
- anticorps de chèvre anti IgG de lapin liés à de
la peroxydase.

20 Les anticorps ont été obtenus dans les conditions
décrites dans l'article susdit.

Essai de détection du DNA-AAF

Des quantités variables de DNA-AAF ont été dépo-
sées sur des filtres de nitrocellulose (Schleicher et
25 Schüll, type BA 85) de 5 mm de diamètre.

L'ADN a préalablement été dilué dans une solution
2 x SSC et dénaturé à 100°C, pendant 5 minutes.

Après dépôt, les membranes ont été mises au four à
80°C pendant 2 heures.

30 Les membranes ont ensuite été traitées avec une
solution 3% albumine bovine (SIGMA ref. A. 7888), 1 SSC,
à 40°C pendant une heure, puis incubées 30 minutes à
température ambiante dans la même solution en présence
d'anticorps anti-DNA-AAF ou anti-Guo-AAF de lapin à
35 2 μ g/ml final.

Après incubation, les membranes ont été lavées

- 5 -

7 fois avec du PBS, à température ambiante, puis mises à incuber 30 minutes dans une solution 3% albumine bovine, 1 SSC contenant des anticorps de chèvre anti IgG de lapin liés à de la peroxydase à 2 µg/ml final.

5 Après lavage 7 fois avec du PBS, la réaction colorée a été faite par addition de la solution suivante, préparée extemporanément :

- 2 mg de 3-amino 9 éthylcarbazol (SIGMA ref. A 5754) dissous dans 0,5 ml de N-N' diméthyl formamide,
- 10 - 9,5 ml de tampon acétate acétique 0,05 M pH 5,1,
- 10 µl d'H₂O₂ (Merk ref. 7209)

Test d'hybridation avec du DNA-AAF utilisé comme sonde .

Dépôt de quantités variables de DNA PWE 6 :

- 1) 100 ng
- 15 2) 10 ng
- 3) 1 ng
- 4) 100 pg

Après dépôt, les filtres sont mis à 80°C pendant 2 heures, puis préhybridés 4 heures à 68°C dans une solution 6 x SSC et 10 x Denhardt.

(1 x Denhardt contenant :

- 0,02% de Polyvinyl pyrrolidone,
- 0,02% du réactif commercialisé sous la désignation FICOLLE 400 par la Société "Pharmacia fine Chemicals".
- 25 0,02% d'albumine bovine)

Ils sont ensuite hybridés dans une solution 2 x SSC 1 x Denhardt en présence de 200 µl par membrane de solution de DNA-AAF préalablement dénaturé contenant respectivement :

- 10 ng/ml final
- 1 ng/ml final et
- 100 pg/ml final

Après hybridation, les filtres ont été lavés

30 minutes dans	2	x	SSC	1	Denhardt
" "	1	x	SSC	1	Denhardt
" "	0,5	x	SSC	1	Denhardt
" "	0,2	x	SSC	1	Denhardt
1' heure	0,1	x	SSC	1	Denhardt

- 6 -

puis incubés pendant 1 heure à 40°C dans une solution contenant 3% d'albumine à 1 xSSC. La suite des opérations a été faite comme précédemment (mise en présence avec des anticorps anti-DNA-AAF ou anti Guo-AAF, lavage PBS, anticorps + peroxydase, lavage PBS et révélation).

Après révélation on observe des taches colorées dont l'intensité (plus forte pour les concentrations élevées, plus faible pour des concentrations basses d'ADN) dépend de la quantité d'ADN hybridé.

La méthode de détection sus-indiquée a conduit à des résultats entièrement négatifs au terme d'essais d'hybridation réalisés entre le témoin négatif (utilisé en des quantités atteignant jusqu'à 90 nanogrammes) et le DNA-AAF.

L'invention ne se limite évidemment pas aux modes de réalisation décrits ci-dessus à titre d'exemples et l'homme de l'art peut y apporter des modifications sans pour autant sortir du cadre des revendications ci-après.

Au titre des variantes utilisables au niveau de la détection des hybrides formés avec la sonde selon l'invention, on citera :

- la révélation des hybrides formés par la radio-activité, par exemple grâce à l'utilisation d'anticorps anti-DNA-AAF rendus radioactifs par de l'iode 125 ou 131 ou de protéine A radioactive, qui va se fixer sur les anticorps ,

Enfin, au titre des variantes d'applications possibles, on citera l'application de la sonde selon l'invention à la purification d'un ADN complémentaire contenu dans une composition initiale, notamment au moyen

- de protéine A associée à un support solide (par exemple constitué de billes d'agarose),
- d'anticorps précipitants associés ou non à un support solide (billes d'agarose, de latex, etc),

pour assurer la précipitation sélective de l'hybride formé.

Enfin fait partie des modifications restant dans le cadre des revendications la substitution possible de

- 7.-

logue susceptible de se fixer dans les mêmes conditions
sur certaines au moins des bases des nucléotides dont est
constituée la sonde.

- 8 -

REVENDICATIONS

- 1 - Procédé de détection de la présence d'une séquence d'acide nucléique telle qu'un gène ou fragment de gène dans une composition ou échantillon présumé la contenir, caractérisé en ce que l'on met en contact cette composition avec une sonde contenant un acide nucléique complémentaire de la séquence d'acide nucléique ou du gène recherché dans des conditions permettant notamment cette hybridation, ladite sonde portant au moins un groupe N-2-acétylamino fluorène fixé de façon covalente à au moins l'une des bases de cette sonde, l'éventuelle présence de la séquence d'acide nucléique ou de gène recherché étant ensuite révélable par action d'anticorps efficaces vis-à-vis de la N-2-(guanosine-8-yl)-acétylamino fluorène ou préalablement préparés vis-à-vis de la sonde portant des résidus d'acétylamino fluorène.
- 2 - Procédé selon la revendication 1 comprenant en outre la séparation de l'hybride formé, en vue de la purification de ladite séquence d'acide nucléique, notamment par précipitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR82/00220

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC ³ : C12Q 1/68		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ³	C12Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in the fields searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT **		
Category *	Citation of Document, ¹⁸ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
P, X	US, A, 4358535 (S. FALKOW et al.), 09 November 1982, see column 1, line 64; column 2, line 17; column 2, lines 32-61; column 3, lines 25-43; claims 1 and 11	1
Y	GB, A, 2019408 (INSTITUT PASTEUR), 31 October 1979, see page 1, line 61; page 2, line 6; claim 1	1
Y	BIOCHEMISTRY, vol. 18, No. 7, published in 1979, Am. Chem. Soc. (Easton, Pa., US), E. Sage et al.: "Reactivity of the antibodies to DNA modified by the carcinogen N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene", see pages 1328-1332	1, 2
A	Chemical Abstracts, vol. 94, No. 13, published on March 30, 1981 (Columbus, Ohio, US) M. Spodheim-Maurizot et al. "Antibodies to N-hydroxy-2-aminofluorene modified DNA as probes in the study of DNA reacted with derivatives of 2-acetylaminofluorene", see page 232, column 2, abstract	1/..
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁸</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search *		Date of Mailing of this International Search Report *
24 March 1983 (24.03.83)		25 April 1983 (25.04.83)
International Searching Authority ¹		Signature of Authorized Officer ²⁰
European Patent Office		

International Application No.

PCT/FR82/00220

-2-

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No ¹⁸
	No. 97632j, Carcinogenesis, 1980, 807-12 (Eng.). ---	1
A	Chemical Abstracts, Vol. 89, No. 21, published on November 20, 1978 (Columbus, Ohio, US), M. Leng et al.: "Antibodies to DNA modified by the carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene", see page 166, column 1, abstract No. 174795r, FEBS Lett., 1978, 207-210 (Eng.) ---	
A	Chemical Abstracts, Vol. 91, No. 5, published on July 30, 1979 (Columbus, Ohio, US) M. Guignes et al.: "Reactivity of antibodies to guanosine modified by the carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene", see page 150, column 1, abstract No. 33858t, Nucleic Acids Res., 1979, 733-744 (Eng.) ---	1
A	Chemical Abstracts, Vol. 92, No. 17, published on April 28, 1980 (Columbus, Ohio, US), G. de Murcia et al.: "Electron microscopic visualization of N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene binding sites in Cole1 DNA by means of specific antibodies", see page 129, column 2, abstract No. 141501a, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 6076-80 (Eng.) (cited in the application) -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 82/00220

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ³		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB. ³ : C 12 Q 1/68		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁴		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB. ³ :	C 12 Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁶		
Catégorie ⁶	Identification des documents cités, ¹⁷ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
P, X	US, A, 4358535 (S. FALKOW et al.) 9 novembre 1982 voir colonne 1, ligne 64 - colonne 2, ligne 17; colonne 2, lignes 32-61; colonne 3, lignes 25-43; revendications 1 et 11	1
Y	GB, A, 2019408 (INSTITUT PASTEUR) 31 octobre 1979 voir page 1, ligne 61 - page 2, ligne 6; revendication 1	1
Y	Biochemistry, vol. 18, no. 7, publié en 1979, Am. Chem. Soc. (Easton, Pa., US) E. Sage et al.: "Reactivity of the antibodies to DNA modified by the carcinogen N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene", voir pages 1328-1332	1, 2
A	Chemical Abstracts, vol. 94, no. 13, publié le 30 mars 1981 (Columbus,	1 ./.
<p>¹⁶ Catégories spéciales de documents cités: ¹⁶</p> <p>«A» document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>«E» document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>«I» document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>«O» document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>«P» document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>«T» document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>«X» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>«Y» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>«&» document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée ¹⁹		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale ²⁰
24 mars 1983		25 APR 1983
Administration chargée de la recherche internationale ¹		Signature du fonctionnaire autorisé ²⁰
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		

Demande Internationale N° PCT/FR 82/00220 -2-

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴ (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, 1° avec indication, si nécessaire des passages pertinents 17	N° des revendications visées 16
	Ohio, US) M. Spodheim-Maurizot et al. "Antibodies to N-hydroxy-2-aminofluorene modified DNA as probes in the study of DNA reacted with derivatives of 2-acetylaminofluorene", voir page 232, colonne 2, l'abrégé no. 97632j, Carcinogenesis, 1980, 807-12 (Eng.)	1
A	Chemical Abstracts, vol. 89, no. 21, publié le 20 novembre 1978 (Columbus, Ohio, US) M. Leng et al.: "Antibodies to DNA modified by the carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene", voir page 166, colonne 1, l'abrégé no. 174795r, FEBS Lett., 1978, 207-210 (Eng.)	1
A	Chemical Abstracts, vol. 91, no. 5, publié le 30 juillet 1979 (Columbus, Ohio, US) M. Guignes et al.: "Reactivity of antibodies to guanosine modified by the carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene", voir page 150, colonne 1, l'abrégé no. 33858t, Nucleic Acids Res., 1979, 733-744 (Eng.)	1
A	Chemical Abstracts, vol. 92, no. 17, publié le 28 avril 1980 (Columbus, Ohio, US) G. de Murcia et al.: "Electron microscopic visualization of N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene binding sites in ColEI DNA by means of specific antibodies", voir page 129, colonne 2, abrégé no. 141501a, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 6076-80 (Eng) (cité dans la demande)	1